

ダイズの莢から得た Phytoalexin について

野中福次・諫山真司・古川英雄

(植物保護学教室)

On the Phytoalexin produced by the results of the interaction
between soybean pods and phytopathogens.

By

Fukuji NONAKA, Shinji ISAYAMA and Hideo FURUKAWA.

(Laboratory of Plant Protection.)

摘 要

ダイズの莢に *Fusarium solani* f. *radicicola* 2, *Glomerella cingulata* および *Gloeosporium olivarum* の分生孢子浮游液を接種して、25°Cに24時間おくと、浮游液中に Phytoalexin (寄主と病原菌との相互反応の結果、寄主から産出される1種の抗菌性物質のことで、MÜLLERにより名づけられた) が滲出してくることを明らかにし、これらの Phytoalexin はその生成に関与した菌に対しても、そうでない菌に対しても同じような発芽抑制作用(活性)を有する。

次に Phytoalexin 滲出液の2, 3の性質について実験した。すなわち、Phytoalexin 滲出液を5倍に稀釈してもその活性はみられ、Phytoalexin 滲出液を5°Cに冷蔵するとき、2日間はその活性はほとんど消失しない。また、新しい孢子浮游液を接種した方が古い孢子のそれを接種した場合に比べて、Phytoalexin 滲出液の活性は大であった。

前記3種の病原菌より得た Phytoalexin 滲出液を等量の石油エーテルで3回振出し、室温、減圧下で溶媒の石油エーテルを除去した振出溜分に、エタノールを加えて、これを光電分光光度計(日立 Perkin-Elmer 139型)で紫外部の吸収スペクトルを測定した結果、3つの Phytoalexin 滲出液の曲線はいずれも 285m μ に極大値、252~255m μ に極小値を有する特徴ある吸収曲線が得られた。この曲線は他の荳科植物から得た Phytoalexin と共通した点がみられた。またこの Phytoalexin のエタノール溶液の稀釈度とこれらの液の孢子発芽抑制率および 285m μ における吸光度との間には相関がみられることから、この吸収曲線を示す物質は Phytoalexin であると結論した。

Summary

Phytoalexin defined by Müller as one of the antibiotics is produced from plant tissues as the result of an interaction between the host and parasite, and inhibits the growths of microorganisms pathogenic to the plant.

This paper reports some experiments on the nature of Phytoalexin produced as a result of the host-parasite interaction between soybean, *Glycine max* L., and following three phytopathogens.

Seed-rooms of opened soybean pods were mounted with each of conidial suspensions

of *Fusarium solani* f. *radicola* 2, *Glomerella cingulata*, and *Gloeosporium olivarium*, and incubated at 25°C for 24 hours. Each of suspensions was collected and centrifuged to obtain the supernatant (Phytoalexin solution). These three kinds of Phytoalexin solutions equally inhibited strongly the germination of conidia of three fungi mentioned above.

Phytoalexin in the diffusate solution scarcely lost its inhibitory activity against spore-germination even when diluted to 1:4 or stored in freezer at 5°C for two days. It was more vigorously produced in case of fresh spore suspension than in case of old spores.

Ten ml. of each of these three Phytoalexin solutions was extracted three times with equal volume of petroleum ether, and the solvent in the extract was evaporated at room temperature in vacuo. Five ml. of ethanol was added to each of the residues and ultra-violet absorption of the ethanol solution was measured by spectrophotometer (Hitachi Perkin-Elmer 139).

Three curves thus obtained showed the maxima at 285m μ and the minima at 252–255m μ (Fig. 1, 2), and were very similar to that of the Phytoalexins produced by other leguminous plants. Moreover, there was a correlation between concentration and biological activity of each of the Phytoalexins from soybean plants and the degree of its optical density. These results indicate that the substances which showed the characteristic absorption curves were of the Phytoalexins from soybean pods.

Laboratory of Plant Protection
Faculty of Agriculture
Saga University
Saga, Japan

結 言

ダイズの莢にダイズ赤かび病菌 *Fusarium* sp. の胞子浮游液を接種すると、莢から1種の抗菌性物質である Phytoalexin (以下 PA と略記) が生成されることを植原は明らかにし、その第1報¹⁴⁾では PA 生成に及ぼす寄生植物の条件の影響、PA 滲出液の稀釈度と発芽抑制作用及び耐熱性などについての報告を行ない、第2報¹⁵⁾では PA 生成に影響を及ぼす寄生菌胞子浮游液の状態について報告し、PA の生成は病原菌胞子の浮游液でのみ誘発されるのではなく、この浮游液を 23°C で24時間置いた後の遠心上澄によっても生成されるという興味ある事実を明らかにした。その後の研究により PA 誘発因子としてはその植物の寄生菌、非寄生菌を問わず^{2, 3, 18)}、また代謝阻害剤や重金属イオンなど^{3, 13, 17)}によっても生成されることが明らかにされた。

一方、CRUICKSHANK^{1, 2, 10)}、植原¹⁶⁾らの研究により PA 滲出液 (植物に胞子浮游液を接種して、24時間おいた後に、この液中に PA が滲出してきたもの) から簡単な操作で PA を比較的純粋なものとして抽出することが可能となったので、著者らは植原^{14, 15, 16)}の方法に準拠して、ダイズの莢に植物病原菌を接種し、PA 滲出液を作り、その2, 3の性質と、その石油エーテル抽出物について実験を行なったので、これらの結果を報告する。

本実験を行なうに当り絶えざる御指導をいただいた恩師九州大学名誉教授吉井甫先生並びに色々と御助言をいただいた畏友広島農業短期大学植原一雄博士に感謝の意を表する。

実験方法および結果

実験1. ダイズの莢と *Fusarium solani* f. *radicicola* 2 との相互反応によって生成される PA の確認

方法：植原の方法^{14,15)}に従って行なった。すなわち、秋ダイズ（品種アキヨシ，豊玉）の種子がまだ十分大きくなっていない未熟な時に採取し，冷蔵庫内に保存して，実験時（実験2以降の場合も同じ）に取り出し供試した。まず莢の縫合線に沿ってメスで切開して2分し，その中の種子を除去した莢を，四つ切りバット（前以てこれに濾紙を敷き，殺菌水を含ませ，その上にガラス板を置いたもの）の中に外表部を下にして並べ，内側の子室に殺菌毛細管ピペットで *F. solani* f. *radicicola* 2（信州大学松尾卓見博士から分譲うけた菌，寄主はエンドウ）の分生孢子（馬鈴薯寒天培地上に5～11日間培養した）の浮游液を接種した。この場合の孢子浮游液の濃度は顕微鏡の150倍拡大率で，1視野当り平均孢子数が50個程度のものを用いた。また対照として，同じように準備した莢の子室に蒸溜殺菌水を置いたもの，およびガラス板の上にパラフィン張り，この上に蒸溜殺菌水を置いたものを用意した。

これらのバットをビニールで覆って，湿室状態にし，25℃の定温器中に24時間静置した後，殺菌スポイドで莢中の接種液を集め，直ちに，6000rpm，15分間，遠心分離器で孢子を沈澱せしめ，その上澄を供試液とした。すなわち，この供試液で *F. solani* f. *radicicola* 2 の分生孢子の発芽試験を行ない，PA生成の有無を検定した。発芽試験はPA滲出液で *F. solani* f. *radicicola* 2 の分生孢子の浮游液を作り，その濃度は顕微鏡1視野当り150倍の拡大率で，40～50個とし，殺菌ホールスライド上で，25℃，15時間保った後，その発芽を測定した。

試験は時期を異にして5回行ない，第3回試験では発芽管長の測定も行なった。

結果：結果は第1表に示す通りである。第3回試験を除き，孢子浮游液接種区と殺菌水接種区，

第1表 ダイズの莢の子室に24時間おいた *Fusarium solani* f. *radicicola* 2 の孢子浮游液の遠心上澄が本菌孢子発芽に対する抑制作用

Table 1. Inhibitory action of supernatant solution of centrifuged spore suspension of *Fusarium solani* f. *radicicola* 2 placed on the seed room of the soybean pod for 24 hrs. at 25°C, against the spore germination of the same fungus.

No. of experiment treatment replication	I		II		III**		IV		V		
	spore suspension on pod	distilled water on pod	spore suspension on pod	distilled water on pod	spore suspension on pod	distilled water on pod	spore suspension on pod	distilled water on pod	spore suspension on pod	distilled water on pod	distilled water on paraffin
1	25.7*	85.8	0	86.1	45.8	100	36.7	81.2	33.8	69.1	61.9
2	20.9	89.9	5.2	78.1	70.8	100	8.7	100	28.1	83.8	84.4
3	19.1	65.1	18.0	74.7	71.3	100	18.7	86.9	33.6	67.2	63.5
4	—	—	—	—	90.7	91.5	35.7	89.3	28.7	78.8	70.1
5	—	—	—	—	91.6	100	43.0	100	28.7	89.2	66.2
6	—	—	—	—	91.9	100	33.9	91.9	20.3	90.9	73.3
average	21.9	80.3	7.7	79.6	77.0	98.6	29.5	93.2	28.8	79.8	69.9

* 数値は発芽率（％），調査孢子数は1回反覆当り約300個

** 発芽管長の比較を第2表に示した

* Percentage of germination. About 300 spores were observed per one trial or attempt.

** Germ-tube lengths were measured and shown in table 2.

またはパラフィン上に蒸溜殺菌水をおいた区との間に、その発芽率を比較すると明瞭な差がみられ、莢上に24時間置いた孢子浮游液は *F. solani* f. *radicicola* 2 の孢子に対して非常に強い発芽抑制を示すことが認められ、植原の結果¹⁴⁾とよく一致した。なお第3回試験では両区間に顕著な差はみられなかったが、その発芽管長を比較した結果、第2表にみられるように、孢子浮游液区の方が殺菌水区より強い抑制作用がみられた。

第2表 Phytoalexin 滲出液で処理した孢子の発芽管長の比較 (第1表の第3回試験)

Table 2. Comparison of germ-tube lengths of spores treated with Phytoalexin solution. (experiment No. III at table 1.)

treatment	germ-tube length	percentage of germination
spore suspension on pod	64.7(μ)	77.0(%)
distilled water on pod	208.0	98.6

実験2. ダイズの莢と各種病原菌との相互作用により生成させる PA の確認、ならびにそれらの PA が各種病原菌の孢子発芽に対する抑制作用

方法：秋ダイズ (品種アキヨシ) を用い、実験1と同様にして行なった。すなわち、供試菌として *F. solani* f. *radicicola* 2, *Glomerella cingulata* (佐大保存菌、佐大農場ブドウ果実より分離)、および *Gloeosporium olivarum* (佐大保存菌、香川県小豆島オリーブ果実より分離) を用い、これらの菌を1週間内外培養して得た分生孢子の浮游液をダイズの莢に接種し、24時間後に得られた PA 滲出液について、前記3種の病原菌の孢子発芽に対する抑制作用を比較した。

結果：結果は第3表に示す通りである。各種病原菌の孢子浮游液より得た PA 滲出液は殺菌水接種区より各種病原菌に対し顕著な孢子発芽抑制を示す。次に *F. solani* f. *radicicola* 2 の孢子浮游液より得た PA 滲出液は、その菌に対しては勿論であるが、その他に *G. cingulata*, *G. olivarum* のいずれに対しても強い発芽抑制作用を示した。同様なことは *G. cingulata* ならびに *G. olivarum* から得た PA 滲出液についても認められた。すなわち、どのような孢子浮游液を接種しても PA 生成はみられ、これらの PA は PA 生成に用いた菌には関係なく、各種の菌に同じような発芽抑制作用を示すことがわかった。

実験3. PA 滲出液の稀釈度とその孢子発芽抑制作用

方法：実験1と同様にして *F. solani* f. *radicicola* 2 の孢子浮游液をダイズの莢に接種して得た PA 滲出液を原液とし、これに蒸溜殺菌水を加えて1(原液)：1(蒸溜殺菌水), 1：4, 1：9の稀釈液(最終濃度はそれぞれ2, 5, 10倍)をつくり、これらの液で *F. solani* f. *radicicola* 2 の発芽試験を行なった。対照には莢上に蒸溜殺菌水をおいたものを用いた。

結果：結果は第4表に示す通りである。PA 滲出液はその稀釈度に比例して発芽抑制作用の減退をきたしたが、2倍、5倍区ではまだ強い抑制作用を示した。10倍区でもいくらかその作用はみられたが、前2者に比べるとその作用は非常に弱まった。この結果は植原の結果¹⁴⁾と大体一致している。

実験4. PA 滲出液を冷蔵した場合の活性の持続性

方法：実験1の方法で *F. solani* f. *radicicola* 2 の孢子浮游液から得た PA 滲出液を5°Cの冷蔵庫内に冷蔵した場合の孢子発芽抑制作用の持続性を対照区と比較した。

結果：結果は第5表に示す通りである。保存日数2日まではその活性(発芽抑制作用)はあま

り低下しない。7日目でも活性はみられるようであるが、相当な低下をきたし、14日目には大体失活するようである。

第4表 Phytoalexin 滲出液の稀釈度と病原菌 (*F. solani f. radicola* 2) 胞子に対する発芽抑制作用

Table 4. Dilution of the Phytoalexin containing solution and the change of the inhibiting power against the spore germination of *F. solani f. radicola* 2.

diffusate and dilution replication		spore suspension on pod								distilled water on pod	
		1 : 0 (original)		1 : 1		1 : 4		1 : 9			
		T	%	T	%	T	%	T	%	T	%
1		140	4.3	130	7.6	120	25.0	124	55.6	81	97.5
2		102	10.8	107	23.3	81	22.2	87	72.3	98	98.9
3		116	1.7	112	23.2	73	21.9	153	73.2	123	94.3
4		82	10.9	135	25.2	134	22.4	170	57.7	128	86.9
5		99	15.1	114	8.7	98	32.5	163	94.3	77	88.3
6		135	9.6	196	10.7	76	36.8	131	87.7	91	94.5
average		8.7		16.4		26.7		73.5		93.4	

T : 調査胞子数, total number of spores measured

% : 胞子発芽率 (%), percentage of germination

第5表 Phytoalexin 滲出液の冷蔵 (5°C) 期間と病原菌 (*F. solani f. radicola* 2) 胞子に対する抑制作用

Table 5. Duration of the Phytoalexin containing solution at 5°C and its changes of the inhibiting power against the spore germination of *F. solani f. radicola* 2.

replication	treatment	0 day		2 days		7 days		14 days	
		spore suspension on pod	distilled water on pod	spore suspension on pod	distilled water on pod	spore suspension on pod	distilled water on pod	spore suspension on pod	distilled water on pod
		T %	T %	T %	T %	T %	T %	T %	T %
1		223 23.1	90 80.0	246 19.1	150 100	106 83.0	73 94.5	184 57.6	106 86.8
2		122 3.3	115 87.0	114 16.6	150 100	154 48.6	150 100	71 92.9	112 80.3
3		141 31.2	100 96.0	125 15.2	150 100	194 56.1	150 100	142 85.9	98 75.5
4		74 9.4	80 95.0	186 4.5	142 91.5	147 49.6	150 100	105 79.0	128 89.0
5		106 10.4	108 93.5	132 40.0	150 100	116 74.1	62 96.8	112 89.3	81 86.4
6		186 4.3	120 85.0	145 17.3	150 100	110 63.6	76 97.3	137 59.1	71 70.4
average		13.6	89.4	16.3	98.6	62.5	98.1	77.3	81.4

T : 調査胞子数, total number of spores measured

% : 胞子発芽率 (%), percentage of germination

実験5. ダイズの莢の子室の傷の有無と PA 生成との関係

方法 : 実験1の方法で *F. solani f. radicola* 2 の胞子浮游液を莢の子室に接種して, PA 滲出液を作る場合の子室の傷の有無と PA 生成についてしらべた。すなわち, 表皮に巾約 1mm, 深さ約 0.1mm 程度の軽い傷を劃線上に 2 ~ 3 本つけ, これに胞子浮游液をおいた場合の PA 生成を無傷の場合, および対照として蒸溜殺菌水を置いた場合と, パラフィン上に胞子浮游液を置いた場合とについて比較した。実験は 5 回にわたり期日を変えて行なった。

第6表 ダイズの莢の子室の傷の有無と Phytoalexin 生成との関係

Table 6. Relation between the wound of the seed room and the Phytoalexin production of the soybean pod.

No. of experiment	spore suspension on pod		sterilized water on pod		spore suspension on paraffin
	non-wound	wound	non-wound	wound	
I	5.3*	—	83.8	95.3	59.5
II	27.1	—	60.7	84.9	—
III	45.7	29.8	91.4	—	—
IV	30.3	39.7	92.1	—	—
V	21.3	31.3	91.2	—	—

* 数値は発芽率 (%), 調査孢子数は1回試験に約1000個

* percentage of germination, about 1000 spores were observed per one trial.

結果：結果は第6表に示す通りである。第1回、第2回試験についてみると、孢子浮游液を無傷の莢上においた場合は前の試験と同じ様に PA の生成はみられた。対照区について、無傷の莢上に蒸溜殺菌水をおいたもの、またはパラフィン上に孢子浮游液をおいたものより、傷のある莢上に蒸溜殺菌水をおいたものの方が良好な発芽を示す傾向がみられた。すなわち、この場合は傷口より寄主の発芽促進物質が滲出したものと考えられる。第3、4、5回試験において、有傷の場合も無傷の場合も PA 生成を認められたが、両者間のその抑制作用には一定の傾向がみられなかった。

実験6. 病原菌の新旧と PA 生成との関係

方法：実験1の方法で、PA 生成試験を行なう場合の孢子浮游液の孢子の新旧と PA 生成との関係についてしらべた。すなわち、馬鈴薯寒天培地に 25°C, 38~42日間培養して得た古い *F. solani* f. *radicicola* 2 の分生孢子と 8~12日間培養して得た新しい同孢子の浮游液をそれぞれダイズの莢の子室に接種し、25°C, 24時間後に得た PA 滲出液について、その活性を比較した。実験は期日を異にして2回行なった。

結果：結果は第7表に示す通りである。新旧いずれの孢子でも PA 生成はみられるが、新しい孢子を接種して得た PA 滲出液の抑制作用が古いそれからよりも大である。同様なことは発芽管長からも認められた。

実験7. PA 滲出液からの PA の抽出とその紫外線吸収スペクトル

第7表 孢子の新旧と Phytoalexin 生成との関係

Table 7. Effect of age of spore to the production of Phytoalexin.

No. of experiment	spore germination	fresh*	old	control
I	percentage of germination	27.1 (%)	59.7	84.9
	germ-tube length	18.0 (μ)	31.0	89.0
II	percentage of germination	9.9 (%)	57.7	91.3
	germ-tube length	14.0 (μ)	43.8	142.3

* 新しい孢子の培養期間は8日~12日、古い孢子の培養期間は38日~42日

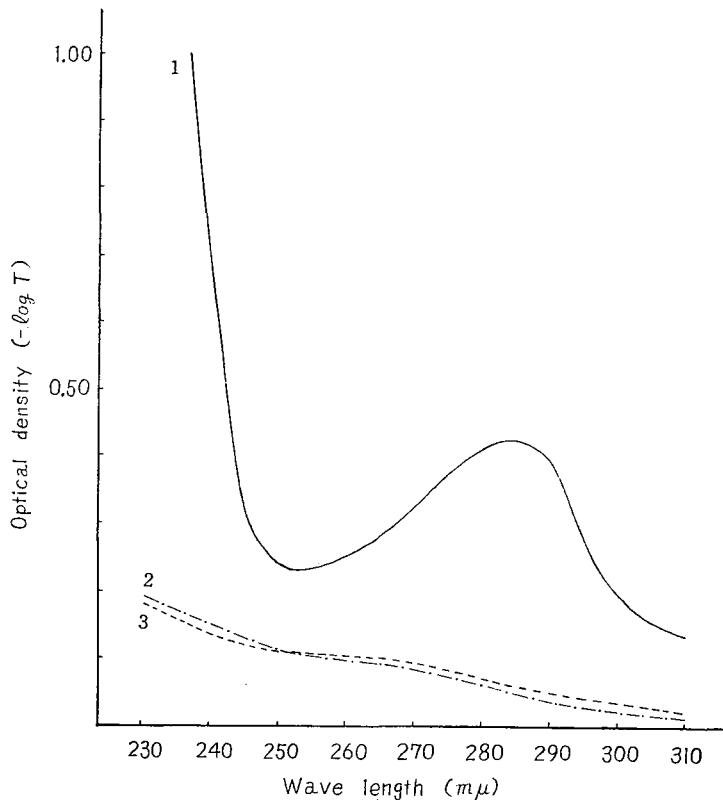
Fresh spore was obtained from potato agar cultured for 8~12 days. Old spore was from the culture 38~42 days old.

その1) *F. solani f. radiculicola* 2 の接種にによって得た PA 滲出液からの PA の抽出とその紫外線吸収スペクトル

方法：実験1の方法で、*F. solani f. radiculicola* 2 の孢子浮游液を接種して PA 滲出液を得、これを CRUICKSHANK¹⁾、植原¹⁶⁾の方法に準拠して、石油エーテルで PA の抽出を行なった。PA 滲出液 10ml を等量の石油エーテルで振出を3回くり返し、その振出液を集め、室温、減圧下で石油エーテルを完全に除去した後、その振出溜分に純エタノール 5ml を添加してよく溶解し、これを光電分光光度計（日立 Perkin-Elmer 139型）で紫外線吸収スペクトルを測定した。対照として莢上に蒸溜殺菌水を置いた区、および、パラフィン張ったガラス板上に蒸溜殺菌水をおいた区を設けて、同様に石油エーテルによる振出処理を行なって比較した。

結果：結果は第1図に示す通りである。PA 滲出液から得た吸収曲線は 285m μ に極大値を、252~255m μ に極小値を有する特徴ある曲線が得られたのに対し、対照区のそれはいずれも吸光度が小さく、極大値もなく全く別な曲線を示した。

その2) 各種病原菌による PA 滲出液からの PA の抽出とその紫外線吸収スペクトル並びに PA 滲出液が孢子発芽管に及ぼす抑制作用



第1図 ダイズの莢と *F. solani f. radiculicola* 2 との相互反応によって生成される Phytoalexin のエタノール溶液が示す紫外線吸収スペクトル

Fig. 1. Ultraviolet absorption spectrum of the ethanol solution of extract obtained from Phytoalexin solution produced by soybean and *F. solani f. radiculicola* 2.

1. Phytoalexin solution
2. Distilled water on paraffin
3. Distilled water on soybean pod

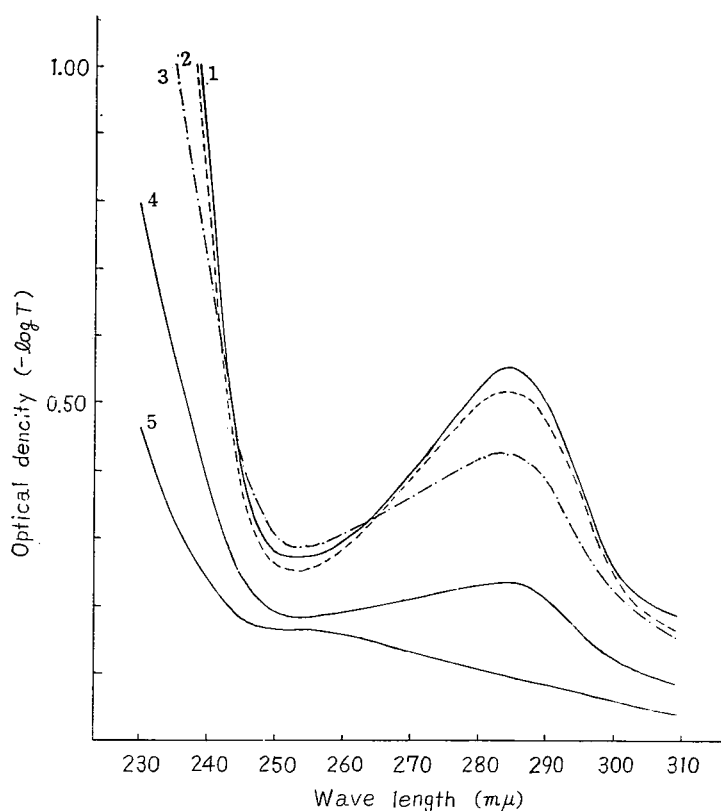
方法：

1) 各種病原菌による PA 滲出液からの PA の抽出：実験 1 の方法で *F. solani f. radicicola* 2, *G. cingulata* および *G. olivarum* の孢子浮游液からそれぞれの PA 滲出液を得、それらの 10ml について、その 1) と同じ方法で石油エーテル振出を行ない、この振出溜分に純エタノール 5ml を加えて、紫外線吸収スペクトルを測定した。

2) PA 滲出液が孢子発芽管に及ぼす抑制作用：1) で得た PA 滲出液の 1 部について、その活性を知るために、*G. cingulata* の分生孢子を用い、その孢子の寒天埋藏ブロック¹⁶⁾を作り、PA 滲出液を入れたホルスライド中で、孢子発芽管に対する伸長抑制作用を比較した。

3) 各種病原菌より得たエタノール溶液の稀釈度と紫外部の吸光度：1) に用いた PA のエタノール溶液を 2 倍 (PA 滲出液と等濃度) と 4 倍にそれぞれエタノールで稀釈し、これらの PA 液の 285m μ (極大値) における吸光度を測定した。

結果：病原菌の PA 滲出液から石油エーテルで振出した PA の紫外線吸収スペクトルは、第



第 2 図 植物病原菌とダイズの莢との相互反応によって生成された Phytoalexin のエタノール溶液が示す紫外線吸収スペクトル

Fig. 2. Ultraviolet absorption spectrum of the ethanol solution of extract obtained from Phytoalexin solution produced by soybean pods and several phytopathogens.

1. Phytoalexin solution produced by soybean and *G. cingulata*.
2. Phytoalexin solution produced by soybean and *F. solani f. radicicola* 2.
3. Phytoalexin solution produced by soybean and *G. olivarum*.
4. Distilled water on soybean pod.
5. Distilled water on paraffin.

2 図に示す通りである。

いずれの PA の吸収曲線も第 1 図の場合と全く同じで、285m μ に極大値、252~255m μ に極小値を有する特徴ある曲線であった。これに対して対照として設けた莢上の蒸溜殺菌水区では吸光度は低い、わずかながら 285m μ に極大値を有する曲線がみられ、第 1 図のそれと少し異なっていた。このように莢上に蒸溜殺菌水をおいた場合には、時により、PA 滲出液においてみられるような曲線が得られ、低濃度に類似物質（すなわち PA）が滲出すると思われる。パラフィン上の蒸溜殺菌水の場合は第 1 図と同様に吸光度の低い、PA 曲線とは異なる曲線であった。

一方、これらの PA 滲出液の孢子発芽管の抑制作用を比較した結果は第 8 表に示すように、対

第 8 表 Phytoalexin 滲出液による孢子発芽管の伸長阻害作用（第 2 図参照）

Table 8. Inhibitory action of the Phytoalexin containing solutions against the growth of spore germ-tube. (cf, Fig 2.)

spore suspension on pod			distilled water	
<i>G. cingulata</i>	<i>F. solani f. radicola</i> 2	<i>G. olivarium</i>	on pod	on pareffin
56.1* (μ)	41.9	38.5	94.0	100.5

* *F. solani f. radicola* 2 の発芽管長

spore germ-tube length of *F. solani f. radicola* 2

照区の発芽管長に比べて各菌の PA 滲出液で強い抑制作用のあることがみられ、PA の存在が確認された。

次に第 2 図にみられる各 PA のエタール溶液をさらにエタノールで稀釈した場合と、その紫外部の吸光度との関係は第 9 表にみられる通りである。その結果 3 種類の病原菌の接種により得られた PA のいずれも、紫外部 285m μ における吸光度の強度と稀釈度には比例関係がみられた。

第 9 表 Phytoalexin エタノール溶液の稀釈度と 285m μ における吸光度との関係

Table 9. Relation between dilution of the Phytoalexin ethanol solutions and their optical density at 285 m μ .

dilution	1 : 0	1 : 1	1 : 3
fungi			
<i>G. cingulata</i>	0.548	0.289	0.148
<i>F. solani f. radicola</i> 2	0.518	0.257	0.130
<i>G. olivarium</i>	0.423	0.217	0.122
control (water)	0.233	0.118	0.066
control (paraffin)	0.097	0.068	0.051

実験 8. PA のエタノール溶液の稀釈度と紫外部の吸光度、および孢子発芽抑制作用との関係

方法： *F. solani f. radicola* 2 の孢子浮游液をダイズ（品種アキヨシ）の莢に接種して得た一定量の PA 滲出液を等量の石油エーテルで 3 回抽出し、室温、減圧下で完全に溶媒を除いた後、これに純エタノールを加えてもとの PA 滲出液と同じ容積にもどし、これを PA 原液とした。この PA 原液を次のように稀釈または濃縮して濃度の異なる PA のエタノール溶液を作った。

(PA 濃度比)

(作製法)

a) 1/5

PA 原液 0.8ml + ethanol 3.3ml

- b) 1/2 PA 原液 2.0ml+ethanol 2.0ml
 c) 1 (PA原液) PA 原液 4.0ml
 d) 2.5 PA 原液を 80°C の water-bath 中で濃縮して, 4.0ml とする (註)
 e) 5 PA 原液 20ml/ を 80°C の water-bath 中で濃縮して 4.0ml とする (註)

(註) PA 原液 (ethanol に溶解した) を 80°C で濃縮しても全くその活性は失なわれないことを予備試験で確かめた。

このようにして調製した PA の各濃度のエタノール溶液について, 前記の分光光度計で紫外部の 285m μ における吸光度を測定した。

次に, これらの各種濃度の PA エタノール溶液を 80°C water-bath の中で加熱して, エタノールを完全に除去した後, 2%エタノール液 4ml/ を添加してこの中によく PA を溶かし込み, 所定の方法で *G. cingulata* の孢子について発芽試験を行ない, 各 PA 濃度による発芽抑制作用を比較した。

第10表 Phytoalexin エタノール溶液の稀釈度と 285m μ における吸光度および孢子 (ブドウ晩腐病原菌孢子) 発芽抑制作用との関係

Table 10. Relation between concentration of the Phytoalexin ethanol solution and their optical density at 285 m μ and the inhibitory action of the Phytoalexin against conidial germination of *G. cingulata*.

concentration	control	1/5	1/2	1	2.5	5
optical density	0	0.175	0.425	0.876	2.45	2.70
total number of spores measured	611	555	587	665	541	567
number of spores germination	98.7 (%)	98.2	95.6	93.1	56.0	57.5
germ-tube length	56.9 (μ)	69.1	61.2	47.5	27.6	23.7

結果：結果は第10表に示す通りである。PA の稀釈または濃縮液と 285m μ における吸光度には第9表と同様な比例関係がみられる。ただ2.5倍および5倍濃度液の吸光度は非常に大きく, 正確な測定はこの濃度では不可能であった。これらの PA の孢子発芽抑制率は PA 原液の1/5, 1/2, 1倍濃度まではあまり認められなかった。この結果は第4表の結果と矛盾するが, これは石油エーテル抽出, 濃縮, エタノール溶解などの操作で PA の一部が消失したためと考えられる。従って, 2.5, 5.0倍濃度に濃縮したものでは明らかかな阻害がみられた。次に, 発芽している孢子の発芽管長を比較した結果は1/2倍までは阻害作用はみられず, 逆に促進的結果がみられたが, 1, 2.5, 5.0倍と濃度が増すと顕著な阻害作用が認められた。

本実験および実験7の結果から, 第1図および第2図に示す 285m μ に極大値を, 252~255m μ に極小値を有する吸収曲線は PA が示す曲線と考えられる。

考 察

ダイズの莢にその病原菌である赤かび病菌 *Fusarium sp.* の分生孢子浮游液を接種すると, ダイズが病原菌の侵入に抵抗して1種の抗菌性物質である Phytoalexin (PA) を生成することはすでに植原^{14,15)}によって明らかにされ, その場合の PA 生成に関与する諸要因並びに PA 滲出液の性質について報告がなされた。本実験は植原の研究成果を参考にし, これに新しい知見を2,

3 追加したものである。

本実験では、まずダイズの莢に *F. solani* f. *radicicola* 2 の分生孢子浮游液を接種して24時間おくと、PA が浮游液中に滲出することを確かめ、次に、この菌の他に *G. cingulata*, *G. olivarium* の分生孢子浮游液を接種した場合にも、同様に PA 生成がみられた。そしてこれらの PA はその PA 生成に関与した菌に対しても、そうでない菌に対しても同じような発芽抑制作用を有することがわかった。PA 滲出液の示すこのような性質は CRUICKSHANK ら^{2,3)}および植原¹⁸⁾によりすでに報告されている。このダイズの PA は病原菌孢子の浮游液の他に浮游液の遠心上澄によっても生成されることを植原¹⁵⁾は明らかにし、ダイズ以外の各種 PA についても、その生成は寄生菌、非寄生菌を問わず^{2,3,18)}、また代謝阻害物質や重金属イオンなど^{3,13,17)}によっても誘発されることが知られている。このように PA はある特定の物質によってのみ誘発されるものではなく、植物の細胞原形質に何らかの刺激を与える物質であればよいのではなかろうかと考えられている。^{4,13,17)}

ダイズの PA 滲出液を5倍に稀釈しても、発芽抑制作用はみられ、10倍稀釈液では大部分が失活するが、これは植原の結果¹⁴⁾と類似していた。

ダイズの PA 滲出液を冷蔵庫中に5°C以下で保存すれば2日までは活性は低下しないが、7日では相当の消失がみられた。PA 滲出液の孢子発芽抑制作用を検定する場合、またはこれから PA の抽出を行なう場合に、PA 滲出液を採集して冷蔵すれば数日間は活性があるのではないかと考えられるので、これを知る目的で本試験を行なった。この結果から、冷蔵して2日以内であればこの目的にかなっていることがわかった。

ダイズの莢の子室を傷つけた場合と無傷の場合の PA 生成量には一定の傾向はみられなかったが、対照区での結果から有傷の場合は蒸溜殺菌水中に発芽促進物質の滲出が考えられる。これは有傷により寄主細胞内から水溶性の促進物質が溶出してくるためであろう。

孢子浮游液の孢子が新しいほど PA 活性が大であるのは、新しい孢子がその発芽率も良好であり、また発芽管の伸長速度も早いので、これが寄主細胞に与える PA 生成のための刺激作用も大きいことによると考えられる。

CRUICKSHANK^{1,3)}、植原¹⁶⁾の方法により、PA 滲出液を石油エーテルで振出し、この溶媒を除去し、その振出溜分をエタノールに溶解して、紫外部の吸光度を調べた結果、285m μ に極大値を、252~255m μ に極小値を有する特徴ある曲線がみられた。そして 285m μ での吸光度と孢子発芽抑制率には比例関係がみられることから、この吸収曲線はダイズの PA のそれと考えられる。

CRUICKSHANK^{1,4,5)}、PERRIN^{10,11,12)}ら、植原¹⁸⁾ならびに著者ら（未発表）がそれぞれ別個に豆科植物から得た PA の紫外部における吸光度を測定した結果を比較すると、エンドウ *Pisum sativum* L. の PA (Pisatin) は極大値 309m μ , 286m μ , 極小値 258m μ , 290m μ , ソラマメ *Vicia faba* L. の PA は極大値 285~286m μ , 極小値 258m μ , カラスノエンドウ *Vicia sativa* L. の PA は極大値 285~286m μ , 極小値 255m μ , インゲンマメ *Phaseolus vulgaris* L. の PA (Phaseolin) は極大値 286m μ となっている。このような各種豆科植物から産出される PA とダイズから産出される PA の吸光度を比較すると、非常に類似した特徴がみられる。すなわち、極大値が 285~286m μ , 極小値が 255~258m μ 附近にあるということである。その中でもダイズの PA はカラスノエンドウの PA と酷似していることが測定結果から推測される。一方 KLARMAN⁶⁾ がダイズに傷をつけて *Phytophthora sojae* を接種すると、本病の抵抗性品種から1種の PA が産出され、その吸光度を測定すると 270m μ と 485m μ に極大値を有する物質であることを報告しているが、この物質は著者らがいう PA とは異なるもののようである。

PA は病原菌が寄主植物に侵入する時、寄主が示す抵抗反応の結果、寄主によって産出される1種の抗菌性物質として MÜLLER^{8,9)}, 水上⁷⁾により明らかにされ、その後植原¹⁹⁾, CRUICKSHANK^{ら³⁾}により、その抗菌作用には病原菌に対し特異性を示すことが確認され、この発見は植物病原菌と寄主植物との間に成立する寄生性の機構を解明するための1つの根拠を与えた。そしてこれらの PA の中には現在、化学物質として抽出、純化されているものも数種類知られており、今後これらの PA は病原菌の寄生性や病害抵抗性の問題を解明するのに大きな役割を果すものと期待される。

引用文献

- 1) CRUICKSHANK, I. A. M. and PERRIN, D. R. (1960) : Isolation of Phytoalexin from *Pisum sativum* L. *Nature*, 187, 799-800.
- 2) ———, ——— (1961) : Studies on Phytoalexins III. The isolation, assay, and general properties of a Phytoalexin from *Pisum sativum* L. *Aust. Jour. Biol. Sci.* 14 (3), 336-348.
- 3) ——— (1962) : Studies on Phytoalexins IV. The antimicrobial spectrum of Pisatin. *Aust. Jour. Biol. Sci.* 15 (1), 147-159.
- 4) ——— (1963) : Phytoalexins. *Ann. Rev. Phytopath.* 1, 351-374.
- 5) ———, PERRIN, D. R. (1963) : Phytoalexins of the Leguminosae. Phaseolin from *Phaseolus vulgaris* L. *Life Science*, 9, 680-682.
- 6) KLARMAN, W. L. (1963) : Resistance of soybeans (*Glycine max*) to three *Phytophthora* species due to the production of a Phytoalexin. *Dissert. Absts.* 23 (1), 4059-4060.
- 7) 水上武幸(1953) : 植物の病害抵抗現象に関する知見(第2報). 葉位を異にした大麦葉片傷面上 *Fusarium solani* を接種した水滴中に現われた同菌分生孢子発芽阻止作用及び本作用の安定度について. *日植病報*, 17 (3-4), 141-143.
- 8) MÜLLER, K. O. Einige einfache Versuche zum Nachweis von Phytoalexin. *Phytopath. Z.* 27 (3), 237-254.
- 9) ——— (1958) : Studies on Phytoalexins I. The formation and the immunological significance of Phytoalexin produced by *Phaseolus vulgaris* in response to infections with *Seclerotinia fructicola* and *Phytophthora infestans*. *Aust. Jour. Biol. Sci.* 11, 275-300.
- 10) PERRIN, D. R. and BOTTOMLEY, W. (1961) : Pisatin, an antifungal substance from *Pisum sativum* L. *Nature*, 191, 76-77.
- 11) ———, ——— (1962) : Studies on Phytoalexins V. The structure of Pisatin from *Pisum sativum* L. *Jour. Amer. Chem. Soc.* 84, 1919-1922.
- 12) ——— (1964) : The structure of Phaseolin. *Tetrahedron Letters*, 1, 29-35.
- 13) ———, CRUICKSHANK, I. A. M. (1965) : Studies on Phytoalexins VII. Chemical stimulation of Pisatin formation in *Pisum sativum* L. *Aust. Jour. Biol.* 18, 803-816.
- 14) 植原一雄 (1958) : ダイズと *Fusarium sp.* との相互反応による Phytoalexin の生成について. I. Phytoalexin の生成に及ぼす寄主植物の条件の影響および Phytoalexin の性質についての2, 3の実験. *日植病報*, 23 (5), 225-229.
- 15) ——— (1959) : ダイズと *Fusarium sp.* との相互反応による Phytoalexin の生成について. II. Phytoalexin 生成に影響を及ぼす寄生菌胞子浮游液の状態. *日植病報*, 24 (4), 224-228.
- 16) ——— (1962) : エンドウの莢から得られた Phytoalexin の紫外線吸収スペクトルによる検定. 広島農業短期大学研究報告, 2 (1), 1-7.
- 17) ——— (1963) : 金属塩による Phytoalexin の生成について. 広島農業短大研究報告, 2 (2), 41~44.
- 18) ——— (1964) : 寄主植物と病原菌との異なる組み合わせによって生成された数種の Phytoalexin の紫外線吸収スペクトルの比較. *日植病報*, 29 (1), 1-5.
- 19) ——— (1964) : 病原菌の宿主特異性と Phytoalexin との関係. *日植病報*, 29 (3), 103~110.